



Nectin-1 Spots as a Novel Adhesion Apparatus That Tethers Mitral Cell Lateral Dendrites in a Dendritic Meshwork Structure of the Developing Mouse Olfactory Bulb

Inoue, Takahito

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2015-06-17

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3286号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003286>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

Nectin-1 Spots as a Novel Adhesion Apparatus That Tethers Mitral Cell Lateral Dendrites in a Dendritic Meshwork Structure of the Developing Mouse Olfactory Bulb

ネクチン1スポットは発生期のマウス嗅球の樹状突起網目状構造において僧帽細胞の側方樹状突起同士を繋ぎ留める新しい接着装置である

神戸大学大学院医学研究科
生化学・分子生物学講座
シグナル統合学分野
(指導教官：的崎 尚 教授)

井上 貴仁

背景

神経細胞は軸索と樹状突起を有し、それらは軸索-樹状突起間シナプスや樹状突起間相互シナプスといった化学シナプスと、ギャップ結合を介する電気シナプスによって結合している。これらのシナプスの機能と構造については近年詳しく解析されている。これらとは別に、神経細胞同士の樹状突起間に接触部位が認められていた。このような接触は、嗅球の外叢状層の僧帽細胞の樹状突起間において最初に見出され、その後、網膜や海馬において報告されてきたが、その機能や構造はほとんど理解されていない。嗅球の外叢状層では、僧帽細胞が樹状突起を側方に伸ばし、他の僧帽細胞の側方樹状突起および一次樹状突起、顆粒細胞の樹状突起と接触部位を形成している。また、僧帽細胞の側方樹状突起と顆粒細胞の樹状突起との接触部位では相互シナプスが形成され、僧帽細胞から嗅皮質へ向かう興奮性シグナルの γ 同期出力が制御されている。相互シナプスの足場となる僧帽細胞の樹状突起の網目状構造は、嗅神経細胞からの匂い情報の処理に重要な役割を果たしているが、この網目状構造がどのように形成されるのかは不明である。

シナプス構造を形成する接着分子には様々なものがあり、その一つにネクチンがある。私の所属する研究室では、ネクチンが細胞外領域を介して同種および異種のネクチンファミリー分子とトランスに相互作用し、隣接する細胞との接着を制御していること、細胞内領域ではアフマディンと結合し、アクチン骨格と連結していることを示してきた。さらに、シナプス結合では前シナプス側にネクチン-1が後シナプス側にネクチン-3がそれぞれ局在していることを示した。

目的

ネクチンがマウス嗅球の外叢状層における僧帽細胞樹状突起間の接触部位に発現し、接着分子として機能しているか検討した。

結果

1. 嗅球の外叢状層深部におけるネクチン-1の特異的な局在

マウスの嗅球において僧帽細胞の樹状突起網が形成される時期である生

後 10 日目に免疫組織学的検討をした結果、外叢状層深部ではネクチン-1 の強い特異的シグナルが観察された。また、ネクチン-1 のシグナルは、僧帽細胞の樹状突起上に重なって観察された。このネクチン-1 シグナルの認められる部位には、他の細胞接着分子（ネクチン-2 や N-カドヘリン）やそれらの結合分子（アフアディン、 β カテニン、 α -アクチニン、ピンキュリン）のシグナルは認められなかった。

2. 僧帽細胞間の接触部位におけるネクチン-1 の超微細構造解析

外叢状層深部において僧帽細胞の樹状突起上に認められたネクチン-1 がどのような接着構造を形成しているかを免疫電子顕微鏡によって解析した。その結果、ネクチン-1 分子は、樹状突起の接触部位において双方の細胞膜上に対称的に位置していた。このネクチン-1 分子が集積している部位の細胞膜間の距離は 20.8 ± 3.3 nm であり、集積していない部位の細胞膜間の距離 (30.1 ± 0.0 nm) よりも有意に近接していた。これらの結果は、ネクチン-1 の分子が双極性に集積している部位では、一定の細胞間距離をもって、細胞膜が接着していることを示しており、この部位を「ネクチン-1 スポット」と命名した。ネクチン-1 スポットは、僧帽細胞の側方樹状突起間の他に、僧帽細胞の側方樹状突起と一次樹状突起間、および僧帽細胞の側方樹状突起と顆粒細胞の棘突起の付け根部分との間にも認められた。

次に、超薄切連続切片の電子顕微鏡解析によってネクチン-1 スポットの三次元構造を再構築した。その結果、ネクチン-1 スポットの集まりは、楕円形もしくは多角形の円盤状の構造体をしており、直径が $0.1 - 3.0$ μ m の大きさであった。

ネクチン-1 スポットの膜構造を免疫電子顕微鏡によって解析した結果、ネクチン-1 スポットでは双極性の細胞膜の肥厚が観察されたが、興奮性や抑制性シナプスのシナプス後膜において観察される細胞膜肥厚よりは薄かった。また、ネクチン-1 スポットに観察される膜肥厚では、パンクタ・アドヘレンシア結合 (PAJ) で特徴的な細胞骨格の密な裏打ちが確認されなかった。この結果は、免疫組織学的な解析によって接着関連分子のシグナルが観察されなかった結果と一致していた。これらの結果から、ネクチン-1 スポットの電子顕微鏡で観察される特徴は他の接着結合 (PAJ、興奮性シナプス結合、抑制性シナプス結合、接着結合、密着結合、デスモソーム) とは異

なり、膜肥厚の程度が薄く、細胞骨格の裏打ちがないことが明らかになった。

3. ネクチン-1 欠損マウスにおける樹状突起間の接触構造の異常

次に、野生型とネクチン-1 欠損マウスの僧帽細胞の樹状突起間の接触構造に差があるかどうかを検討するために、電子顕微鏡観察によって純形態を比較した。野生型マウスの嗅球の外叢状層深部では、僧帽細胞の樹状突起間に双方の細胞膜が肥厚したネクチン-1 スポット様の接触部位が観察されたが、ネクチン-1 欠損マウスでは、野生型マウスの接触部位に比べて小さく、細胞膜の肥厚度合いも少なく、部分的に相互の接触が剥離しているところも観察された。これらの結果から、ネクチン-1 はネクチン-1 スポットの電子顕微鏡学的特徴である細胞膜間の近接と膜肥厚に関与し、樹状突起間の接触に機能していることが明らかになった。

4. 発生期依存的なネクチン-1 の発現

僧帽細胞の側方および一次樹状突起の伸展は胎生期 15-16 日目から始まり、生後 4 週目あたりで樹状突起網が完成する。また、顆粒細胞は生後 3 週間でこの樹状突起網と相互シナプスを形成することが知られている。そこで、ネクチン-1 スポットが発生期のいつ頃形成されるかを検討するために、生後 5、10、70 日目の嗅球におけるネクチン-1 のタンパク質発現量を組織免疫染色法とウエスタンブロット法によって検討した。ネクチン-1 の発現量は、生後 10 日目に最大となり、その後減少した。この結果から、外叢状層深部におけるネクチン-1 の発現量は、生後に樹状突起網が形成される時期に最も高く、形成後には減少していくことが明らかになった。

考察

免疫組織化学的解析と電子顕微鏡学的解析により、ネクチン-1 が発生期のマウス嗅球の外叢状層深部において、僧帽細胞の側方樹状突起間および、側方樹状突起と一次樹状突起間、側方樹状突起と顆粒細胞の樹状突起の棘突起付け根間に対称的に細胞膜接触部位に濃縮していること、そして、その接触部位では細胞膜が肥厚していることが明らかになった。一方、ネクチン-1 が欠損すると、この双極性の細胞膜の肥厚は減少し、部分的に剥離することが明らかになった。これらの結果から、ネクチン-1 が僧帽細胞の側方樹状突起間の接触部位におい

て、同種親和性にトランスに相互作用し、これらの細胞膜を結合させていると考えられた。ネクチン-1が対称性に局在している僧帽細胞の側方樹状突起間の接触部位の呼称がなかったため、「ネクチン-1 スポット」と命名した。

ネクチン-1 スポットにおける細胞膜間隙は、接着構造のない細胞膜間隙よりも短く、PAJの間隙と同程度であった。しかし、ネクチン-1 スポットで接触する細胞膜の大部分では、細胞膜肥厚は認められるものの、PAJなどの既知の細胞骨格裏打ち構造とは関係していなかった。したがって、ネクチン-1 スポットは新しい接着装置を形成していることが明らかになった。

ネクチン-1 スポットの三次元構造解析によると、僧帽細胞の側方樹状突起間でネクチン-1 スポットが凝集し、楕円または多角形に並んでいた。一般に、接着分子の凝集は、細胞外領域を介するトランス相互作用と細胞内領域を介する細胞骨格との相互作用により誘導される。これまでに、海馬のPAJや非神経細胞において、ネクチンは細胞内領域を介してアフアディンと結合し、細胞骨格と連結していること、さらには、アフアディンはネクチンが起点となった細胞接着部位にカドヘリンを動員することが示されている。しかし、ネクチン-1 スポットにはアフアディンが局在していなかった。これは典型的なアクチン骨格と他の接着分子がネクチン-1 スポットに認められなかった理由の一つと考えられた。しかし、なぜ、ネクチン-1 がネクチン-1 スポットでアフアディンと結合しないかや、ネクチン-1 スポットにおいて、向かい合う細胞膜が肥厚する機序、およびネクチン-1 がトランス結合して凝集する機序は不明である。未知の細胞膜タンパク質がネクチン-1 の細胞内領域と結合している可能性や、この未知の細胞膜タンパク質の細胞内領域に結合した他の未知の細胞膜タンパク質が同じ細胞膜上でネクチン-1 の細胞外あるいは細胞内、あるいは両方の領域とシスに相互作用している可能性が考えられた。

ネクチン-1 同士の結合強度は、ネクチン-1 とネクチン-3 の結合強度と比べるとはるかに弱い。ネクチン-1 の発現が発生期に最も高かったことから、ネクチン-1 スポットが樹状突起の伸展のある特別の時期において一過性に使用されるのに適した接着装置であると考えられた。しかし、ネクチン-1 がそのような時期にどのように発現の制御がなされているかは不明であり、ネクチン-1 の発現制御の機序やネクチン-1 スポットの生理学的役割を理解するにはさらに研究する必要がある。

論文審査の結果の要旨

受 付 番 号	乙 第2143号	氏 名	井上 貴仁
論 文 題 目 Title of Dissertation	<p>ネクチン1スポットは発生期のマウス嗅球の樹状突起網目状構造において僧帽細胞の側方樹状突起同士を繋ぎ留める新しい接着装置である</p> <p>Nectin-1 Spots as a Novel Adhesion Apparatus That Tethers Mitral Cell Lateral Dendrites in a Dendritic Meshwork Structure of the Developing Mouse Olfactory Bulb</p>		
審 査 委 員 Examiner	<p>主 査 古屋敷 智之 Chief Examiner</p> <p>副 査 匂坂 敏朗 Vice-examiner</p> <p>副 査 橋本 秀樹 Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【目的】嗅球の外叢状層では僧帽細胞の樹状突起が網目状構造を形成し、匂い情報の処理に重要な僧帽細胞と顆粒細胞の相互シナプスの足場を形成している。この網目状構造には僧帽細胞の側方樹状突起間にシナプスとは異なる接触部位が存在するが、その機能や構造はほとんど理解されていない。ネクチンファミリー分子は細胞間接着分子の一つであり、ネクチン-1、ネクチン-2、ネクチン-3、ネクチン-4からなる。同種あるいは異種のネクチンファミリー分子が細胞外領域を介してトランスに相互作用し、隣接する細胞との接着を制御している。そこで本研究では、マウス嗅球の僧帽細胞樹状突起間の接触部位におけるネクチン-1やその他の細胞間接着分子の局在を調べ、さらにネクチン-1がこの部位の接着分子として機能しているかを検討した。

【方法】生後10日目のマウス嗅球を用いて、免疫組織学的手法により外叢状層において発現しているネクチンなどの接着分子およびその結合分子の局在を検討した。免疫電子顕微鏡による解析により、接着構造におけるネクチンの集積やその長さ、またネクチンの集積と細胞間の距離や膜構造との関連を検討した。また、超薄切連続切片を作製し、三次元構造を再構築し、その形状を詳細に検討した。ネクチン-1欠損マウスの嗅球を用いて、電子顕微鏡による解析により、ネクチン-1の僧帽細胞樹状突起間の接着構造への寄与を検討した。生後5、10、70日目のマウス嗅球を用い、免疫組織学的手法およびイムノプロット法にて、発達期におけるネクチン-1の発現変化を検討した。

【結果】

1. 生後10日目のマウスの嗅球外叢状層深部において、僧帽細胞の樹状突起間の接触部位に、ネクチン-1分子が対称性に集積していた。このネクチン-1シグナルの認められる部位には、ネクチン-2やN-カドヘリンやそれらの結合分子のシグナルは認められなかった。
2. このネクチン-1分子の集積部位では、細胞膜間の距離が有意に近接し、細胞膜の肥厚も観察され、接着構造を形成していたが、パンクタ・アドヘレンシア結合(PAJ)で特徴的な細胞骨格の密な裏打ち構造は観察されなかった。この新規の接着装置を「ネクチン-1スポット」と命名した。
3. ネクチン-1スポットは、僧帽細胞の側方樹状突起間や側方樹状突起と一次樹状突起間、側方樹状突起と顆粒細胞の棘突起の付け根部分との間に認められた。
4. ネクチン-1スポットの集まりは、接着部位の細胞膜上に楕円形もしくは多角形の円盤状の構造体をしていた。

(つづく)

5. ネクチン-1 欠損マウスでは、野生型マウスに比べ、僧帽細胞の樹状突起間の接触部位が小さくなり、細胞膜の肥厚度合いも少なく、部分的に相互の細胞膜の接触が剥離していた。この結果から、ネクチン-1 が僧帽細胞の樹状突起間の接着に機能していることが明らかになった。
6. ネクチン-1 の発現量は、生後 5 日目から 10 日目にかけて最大となり、その後減少した。

【結論】ネクチン-1 は、発生期にマウス嗅球僧帽細胞の樹状突起間の接触部位において、新しい接着装置である「ネクチン-1 スポット」を形成し、一過性に樹状突起同士を繋ぎとめることにより、樹状突起の網目状構造の形成に寄与している可能性が示された。

以上、本研究は、マウス嗅球の僧帽細胞の樹状突起間の接触構造を形成する分子を同定し、パンクタ・アドヘレンシア結合とは異なる新規の接着構造の存在を明らかにしたものであり、細胞間接着分子による神経回路形成機構を理解する上で重要な貢献をしたものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。